

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 7/62	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/22659  (43) 国際公開日 1992年12月23日 (23. 12. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00751 (22) 国際出願日 1992年6月11日 (11. 06. 92)  (30) 優先権データ 特願平3/167811 1991年6月11日 (11. 06. 91) JP 特願平3/324953 1991年12月10日 (10. 12. 91) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘紡株式会社 (KANEBO, LTD.) [JP/JP] 〒131 東京都墨田区墨田五丁目17番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 持田晃一 (MOOHIDA, Koichi) [JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区下鴨森本町15番地 財団法人 生産開発科学研究所内 Kyoto, (JP) 近藤義和 (KONDO, Yoshikazu) [JP/JP] 〒747 山口県防府市国衙二丁目5番31号 Yamaguchi, (JP) 松井雅男 (MATSUI, Masao) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市北園町7番18号 Osaka, (JP) 市橋邦夫 (ICHIHASHI, Kunio) [JP/JP] 〒573-01 大阪府枚方市長尾西町三丁目7番2号 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 朝日奈宗太, 外 (ASAHI, Sohta et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区谷町二丁目2番22号 NSビル Osaka, (JP)	(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, OH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), MO (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.  添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING POLYHYDROXY ORGANIC ACID ESTER		
(54) 発明の名称 ポリヒドロキシ有機酸エステル製造法 (57) Abstract <p>An efficient process for producing a biodegradable polymer by using a microorganism which can produce a polymer at a high rate, has a high intracellular accumulation ratio and is safe and readily handleable; and a process for separating and purifying safely and efficiently a polyhydroxy organic acid ester accumulated in a microorganism. A process for producing a polyhydroxy organic acid ester, characterized by culturing a rhodobacter under an aerobic condition to produce a polymer comprising a polyhydroxy organic acid ester; and a process for separating and purifying a polyhydroxy organic acid ester accumulated in a microbial cell, characterized by comprising the step of adding a lytic enzyme to a cell suspension to dissolve cell walls, the step of separating and recovering polyhydroxy organic acid ester granules present in a cytoplasm, said granules being each coated with a granulosa and having a diameter of 0.1 <math>\mu</math>m or above, and the step of removing the granulosa by treating with a protease.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

ポリマーの生産速度が大きく、菌体内蓄積率が高くさらに安全で取扱いが容易な微生物による、効率的な生分解性ポリマーの製造法およびポリヒドロキシ有機酸エステルを蓄積する菌から安全に、効率よくポリヒドロキシ有機酸エステルを分離・精製する方法を提供する。

ロドバクター属に属する微生物を、好気条件下で培養し、ポリヒドロキシ有機酸エステルからなるポリマーを生産させることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法およびポリヒドロキシ有機酸エステル蓄積菌体からポリヒドロキシ有機酸エステルを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程ののち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以上のポリヒドロキシ有機酸エステル顆粒について、これを分離回収して集める工程とし、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの分離・精製法である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT オーストリア  
AU オーストラリア  
BB パルバードス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コート・ジボアール  
CM カメルーン  
CS ナエコスロバキア  
DE ドイツ  
DK デンマーク  
ES スペイン

FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GN ギニア  
GB イギリス  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
IE アイルランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ  
MG マダガスカル  
ML マリ

MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア  
RU ロシア連邦  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SN セネガル  
SU ソヴィエト連邦  
TD チャド  
TG トーゴ  
UA ウクライナ  
US 米国

(1)

## 明 細 書

## ポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法

## 技術分野

本発明はロドバクター属の微生物を用いたポリヒドロ  
5 キシ有機酸エステルの微生物学的製造法およびポリヒド  
ロキシ有機酸エステル蓄積菌体からポリヒドロキシ有機  
酸エステルを分離・精製する方法に関する。

## 背景技術

従来より各種の微生物が自己の栄養源、エネルギー源  
10 としてポリヒドロキシ酪酸などのポリヒドロキシ有機酸  
エステルを製造、蓄積することが知られている。微生物  
が製造するポリヒドロキシ有機酸エステル（以下、PHA  
Aという）は、生物分解性を有し、これまでも成型樹脂、  
医薬・農薬製剤、医療器材などの材料として各方面で利  
15 用が期待されている。

また、最近は環境保護の観点からプラスチックなどの  
産業廃棄物の処理問題において自然分解性を有するポリ  
マーが求められており、各種の微生物を利用したポリマ  
ーの製造の提案がなされている。たとえば、英国特許第  
20 1370892 号にはハイフォミクロビウム・ヴァリアピレ、  
シュードモナス・ロゼア種内の特定の菌株が、また、ジ  
ャーナール オブ ジェネラル ミクロバイオロジー (J.  
of General Microbiology) 1977, 98, 265~272 頁には、  
メチロバクテリウム、オルガノフィラムおよびシュード  
25 モナス AM-1などが、特開昭56-117793 号公報にはメチロ

(2)

バクテリウム・オルガノフィラム種が、特開昭57-74084号公報にはアルカリゲネス属(A. ファセカリス、A. ルーランディイ、A. ラッス、A. アクアマリヌス、A. ユートロファス)が、特開昭57-150393号公報にはA. ユートロファスが、特開昭59-220192号公報にはノカルジア、アゾトバクター、バシラス、ミクロコッカス、リゾビウム、ロドスピリルム、メチロバクテリウム、シュードモナス、ヒドロゲモナスが、特開昭60-199392号公報にはアルカリゲネス・レイタスが、特開昭60-214888号公報にはアルカリゲネス属が、特開昭60-251889号公報にはアゾトバクター・ビネンランディイまたは変異株が、特開昭61-293385号公報にはアルカリゲネス・ユートロファスが、特開昭62-55094号公報にはプロトモナス属が、特開昭63-198991号公報にはアゾトバクター・ビネンランディイ、アルカリゲネス・ユートロファス、ズーグレアラミゲーラ、バチルス・メガテリウムが、特開昭63-226291号公報にはシュードモナス・オレオボランス種が、それぞれ記載されている。また、紅色無硫黄細菌に属する微生物の菌体蓄積物として多糖質、ポリリン酸とともに20にポリβヒドロキシ酪酸が見出されている(バージェイズ・マニュアル・オブ・システムティックバクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) 1658頁参照)が、ロドバクター属に属する微生物を用いてPHAを製造する提案はまったくなされていない。

25 したがって、ロドバクター属に属する微生物を用いたばあいのPHAの収量に対するpHの影響、よりよい炭素源および効果的な添加物については従来まったく研究されておらず、したがってまったく知られていない。

(3)

また、ポリマーの微生物学的製造に対する酵母の添加の検討は行なわれたことがなかった。

一方、従来、菌体内 P H A の分離・精製は、クロロホルム、ジクロルエタンなどといった塩素系有機溶媒を用いて行なわれていた（たとえば、特開昭 61-35790 号公報参照）。しかし、抽出に必要とされる溶剂量がきわめて大量であるばかりでなく、抽出した溶液の粘度も非常に大きく該溶液からのポリマーの分離・精製が困難である。

さらに、毒性および環境に対する影響に鑑みれば、この  
10 ような有機溶媒を多量に用いる方法は好ましくない。実際に、これらの有機溶媒の使用は漸次、法的に規制される方向である。

また、塩素系以外の有機溶媒であるジオキサンを用いた方法もあるが（特開昭 63-198991 号公報参照）、ポリ  
15 マーの溶解性の点で、ジオキサン溶液の温度を 80 度以上という高温にしなければならず、作業性の点や P H A が分解・劣化するなど実用性に欠けるものである。

有機溶媒を用いない方法としては、特開昭 60-145097 号公報に記載の方法があげられる。これは、P H A 含有  
20 菌体を蛋白分解酵素および／または界面活性剤で可溶化したのちに P H A を含む不溶性残留物を分離する方法である。このような方法では、蛋白分解酵素および／または界面活性剤により非選択的に細胞膜や蛋白質が可溶化され P H A 含有液の粘度が著しく高くなる。そのため、  
25 溶液からの P H A 顆粒の分離・回収操作が困難になり、不純物除去のための濾過、遠心分離などの分離・回収操作も不可能となる。また、分離・精製操作中に P H A が細胞質および蛋白質酵素加水分解物と混在し、安定な懸

(4)

濁液となるため、遠心分離によってP H Aを集めるためには凝集剤を添加してフロックを形成させなくてはならない。これにより凝集剤添加という工程が増えるだけでなく、フロック中にはP H A以外の成分が含まれること5になるため、製造コストの面でもP H Aの純度の面でも不都合である。

特開昭63-226291号公報には、菌体をスフェロプラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破砕し、そして遠心分離したのちに形成される最上層(P H A)を10分離する方法が記載されている。この方法では、音波振動処理によりP H A含有液の粘度はやはり著しく上昇する。また、浮上したP H Aを分離するため、P H Aと同比重である不純物を除去することができない。

本発明は、かかる実情に鑑み、生産速度が大きく、菌15体内蓄積量が大きく、さらに安全で取扱いが容易な微生物による、効率的な生分解性ポリマーの製造法を提供することおよび有機溶媒をまったく用いず、かつP H A含有液の大幅な粘度アップを抑え、また凝集剤の添加のような余分の工程も不要な純度の高いP H Aの分離・精製20法を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明は、ロドバクター(Rhodobacter)属に属する微生物を、好気条件下で培養し、P H Aを菌体内に蓄積させることを特徴とするP H Aの製造法および、P H A25蓄積菌体からP H Aを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程の

(5)

のち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径0.1  $\mu\text{m}$ 以上のPHA顆粒について、これを分離回収して集める工程と、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするPHAの分離・精製法に関する。

本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、病原性がなく、そのため安全で取扱いが容易なロドバクター属に属する微生物を用いてPHAを有効に生産しうることに、さらに驚くべきことに、その際従来常識とされていた嫌気条件（酸素が存在しない条件）下では生物の増殖速度と菌体内へのPHAの蓄積速度が極めて低く、従来まったく採用されていない好気条件（酸素を含有する条件）下において非常に有効に蓄積が行なわれることおよび1段階の培養によっても2段階の培養によっても有効に行なわれることを見出した。

また、さらに研究を重ねた結果、ロドバクター属に属する微生物を用いたPHAの微生物学的製造法において、培養液のpHが4.5未満になると菌体内に蓄積されたPHAの消費が進むこと、培地への酵母添加によりPHAの蓄積が増大すること、および培地成分の炭素源として主にマンニットを用いることによりPHAの生産が有効に行われうることを見出した。また、溶菌酵素を用いることによりPHA顆粒膜を損なうことなく細胞壁のみを溶解することで、PHAを顆粒として他の細胞成分より容易に分離しうることに、さらにPHA顆粒から容易に膜成分を除去しうることも見出した。

本発明は前記の多くの知見にもとづいて完成されたものである。

(6)

つぎに本発明の P H A の製造法について説明する。

本発明において用いられるロドバクター属に属する微生物としては、好気培養により菌体内に P H A を蓄積できるロドバクター属に属する微生物であればいずれも用  
5 いられる。たとえばロドバクター キャプスレイタス  
(R. capsulatus)、ロドバクター スフェロイデス (R. sphaeroides)、ロドバクター スルフィドフィルス  
(R. sulfidophilus)、ロドバクター アドリアティク  
ス (R. adriaticus) およびロドバクター ベルドカンピ  
10 イ (R. veldkampii)、ならびにそれらの P H A 貯蓄変異  
株などがあげられる。

本発明におけるロドバクター属に属する微生物の培養方法としては、前記のように、嫌気条件下における培養では生物の増殖速度と菌体内への P H A の蓄積速度が極  
15 めて低く、好気条件下における培養が非常に有効である。  
好気条件とは、通常酸素存在下にて培養することである。  
酸素が存在しない条件 (嫌気条件) 下では、本発明の方法は非常に効率が低い。

ロドバクター属に属する微生物による P H A の製造条  
20 件としては、とくに光合成条件下での培養は必要ない。

培養温度は通常 45℃ 以下、好ましくは 30～40℃ である。  
p H は通常 4.5 以上、好ましくは 6～9、さらに好ましくは 6.5～8 である。

チッ素源は微生物の増殖には必須であるが、P H A の  
25 蓄積には必要ではない。したがって、チッ素源を含有する培地で菌体を増殖 (前培養) させて収穫したのちチッ素飢餓培養を行ない、菌体内に P H A を蓄積させる 2 段階方式により製造することができる。ここでいうチッ素



(7)

飢餓とは、培地液中に含まれるチッ素分が  $1 \text{ g} / \ell$  以下、好ましくは  $0.5 \text{ g} / \ell$  以下、さらに好ましくは  $0.2 \text{ g} / \ell$  以下であることをいう。前培養を行なうばあいは、好気条件下、栄養素の制限なしに、対数増殖期となるまで、すなわち菌数濃度が少なくとも  $10^7 / \text{ml}$  となるまで行なわれる。

あるいは、前述のように細菌の増殖と、それに続くチッ素飢餓培養による本発明ポリマーの生産という2段階方式ももちろん可能であるが、培地に当初よりチッ素源を混入しておき増殖と同時に P H A を蓄積させる1段階方式によりポリマーを蓄積させることも可能である。こうして1段階で培養しうることにより、前培養（チッ素存在下）で増殖してえた菌体を集菌し新たなチッ素飢餓培地へ移動して培養する必要がなく、工程の短縮化・コストの低減はもちろん、回収・分離・生成という工程を経ないために菌体のロスが極めて少なく、工業的に極めて有利である。

チッ素源は、無機物たとえば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどから選ぶことができ、有機物としてはアミノ酸、尿素などを利用することができる。

微生物の栄養源としては、微生物の培養を阻害しない炭素源ならなんでも用いることができる。たとえばメタノール、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムなどの有機酸塩、グルコースなどの糖質など安価なものがあげられる。好ましくは、マンニット、酢酸、プロピオン酸、フラクトース、グルコースである。

しかしながら、とくにマンニットを炭素源とするとき

(8)

は、培養液中に有機酸が蓄積しないため、pHが7以下とならない。さらに、培地中に少量のNH<sub>4</sub>塩が存在したばあいでもオートクレーブ処理に伴うアミノカルピノール反応がなく、したがって、この反応の生成物による  
5 菌体の増殖抑制が起こらないため、大変有利である。本発明の製造法の1つは、マンニットを主成分とした炭素源を用いてロドバクター属に属する微生物を培養することによってPHAを製造する方法である。

培養液中での炭素源の濃度としては、通常5%（重量  
10 %、以下%という）以下、好ましくは0.5～3%、さらに好ましくは1～2%である。また、その他に微生物の培養に必須の成分たとえば、硫酸マグネシウム、リン酸カリウムなどの無機塩、チアミン、ビオチンなどの要求される微量元素、その他当然必要とされる成分が必要で  
15 ある。これらの成分は試薬を使用してもよく、天然物としてえられる材料たとえば廃棄物そのものやこれを一部使用した合成培地によることができる。

本発明の製造法の1つは、さらに培地に酵母を加えることを特徴とするPHAの製造法である。酵母を加える  
20 ことにより、菌体内に蓄積するPHAは著しく増大する。ここで「酵母」とは、酵母菌体、酵母死菌体または酵母エキスを意味する。添加する酵母は酵母エキスが好ましい。酵母の添加量は通常0.1～3 g/ℓ、さらに好ましくは0.5～2 g/ℓであり、酵母エキスの添加量として  
25 は通常0.1～2 g/ℓ、好ましくは0.2～1.5 g/ℓである。

炭素源など栄養源は、培養初期に投入してもよいが、通常消費量に応じて随時追加すればよい。たとえば、連

(9)

続的に追加したり、断続的に追加することもできる。

培養中のpHは、炭素源として酸のナトリウム塩などを用いたばあい、その消費にともなって上昇するが、炭素源として糖質を用いたばあい、その消費にともな  
5 て下降する。一方、培養液のpHが4.5未満となったばあいには、菌体内に蓄積されたPHAの消費が急速に進行する。本発明の製造法の1つは、蓄積開始後集菌までの培養液のpHを4.5以上に、好ましくは6.0～9.0、さらに好ましくは6.5～8.0に保持することを特徴とす  
10 る製造法である。pHを保持する方法はとくに限定されないが、たとえば、滅菌した水酸化ナトリウムや水酸化カリウムまたは塩酸の希釈溶液をpHに連動してポンプを作動せしめて滴下し、適切なpH値に保持することができる。このようにpHを4.5以上に保持することで、  
15 PHAの収量は著しく増大する。

細菌中へのPHAの蓄積は、光学顕微鏡や位相差顕微鏡や電子顕微鏡などで監視できる。本発明における細菌内でのPHAの蓄積率は、条件により異なるが通常少なくとも20%、好ましくは少なくとも40%、さらに好まし  
20 くは少なくとも60%である。本発明の特徴の1つとして、この蓄積率が従来報告されている値より高く、菌体重量あたりのPHA生産量が大きく、抽出効率もすぐれている。

PHAの蓄積が、少なくとも20%程度、好ましくは40  
25 %以上に達したら、培養液より細菌を分離する。生成したPHAの菌体内からの分離・回収方法としては、従来提案されている公知の方法のいずれによってもよい。

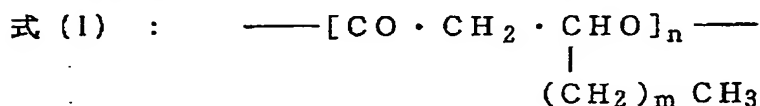
たとえば凍結乾燥菌体、熱風乾燥菌体、アセトンまた

(10)

はメタノールによる脱水菌体に無極性溶媒としてたとえばクロロホルムを加えてPHAを溶出せしめ溶媒を留去すれば主としてPHAからなる残留物がえられる。または、菌体内部の生成PHAの含有率が高いばあいは菌体5からPHAを抽出することなく菌体ごと使用してもよい。

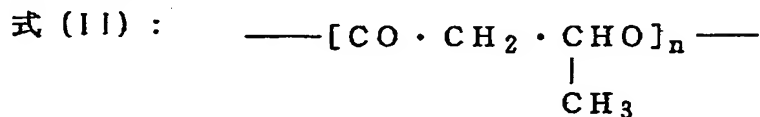
しかしながら、菌体内のPHA顆粒が大きいばあいには、後に詳述する本発明のPHA分離・精製法によって分離・精製を行なうのが有利である。

ここで、PHAとは、以下の式(I)で示される、菌体10内に蓄積されるポリマーまたはコポリマーである。



(式中、mおよびnは整数を表わす)

そのようなPHAとしては、たとえば下記の式(II)で示されるポリ-β-ヒドロキシ酪酸エステル(以下、PH15Bという)よりなるポリマーまたはPHBよりなるポリマーが主成分となるポリマーがあげられる。



(式中、nは前記と同じ)

そのばあいは、他の成分として、炭素数5以上の有機20酸エステル成分も含まれてもよい。さらに、β-ヒドロキシ酪酸エステル、β-ヒドロキシ吉草酸エステルよりなるポリマーがあげられる。

この構造の定性的な分析は、IR、NMRなどによって行なうことができる。また、熱に対する性質はDSC、

(11)

T M A などによって可能である。ポリマーの分子量は粘度法、G P C 法などにて測定できる。生物分解性は、該ポリマーをフィルムなどに成型し土中に埋込み、一定期間中での物性（強度、伸度）や形態（表面、断面）や分子  
5 5 子量の変化などを測定することにより可能となる。

本発明によるポリマーは、有機溶剤、たとえばクロロホルム、ジクロルメタン、1, 2-ジクロルエタン、および1, 2-ジクロルプロパンなどに可溶であり、それらの溶剤を使用することにより従来の方法にて抽出できる。また、  
10 P H A のフィルムを一般的な庭土に埋めると、約一週間程度からフィルム表面に亀裂が発生し始め、続いて強度、伸度の低下が見られ、明らかに分解していることを示す。

本発明によりえられる該ポリマーは、生分解性を生かした用途、たとえばプラスチックボトル、釣糸、包装紙、  
15 手術用糸、医療用コーティング剤などに有用である。

つぎに本発明の P H A 分離・精製法について説明する。

本発明において用いられる P H A 蓄積菌体は、ロドバクター属、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属またはバチルス (*Bacillus*) 属に属する微生物、その他 P H A を菌体  
20 内に蓄積する微生物であればいずれの菌体でもよい。

このような P H A を菌体内に蓄積する微生物では、P H A は顆粒として顆粒膜に包まれて菌体内に存在する。P H A 顆粒膜は、P H A 合成酵素および P H A 分解酵素などの蛋白質と微量のリン脂質からなるもので、菌体内  
25 で P H A を細胞質から隔離し、顆粒を安定な形状に保つ働きをしている。

菌体中の P H A 顆粒の粒径は  $0.1 \mu m$  以上であればよい。粒径が  $0.1 \mu m$  未満のばあいには分離・回収が格段

に困難になりかつ $0.1 \mu\text{m}$ 未満の分率が相対的に少なく、 $0.1 \mu\text{m}$ 未満のPHA顆粒を除外したとしても実用上は問題ない。分離操作を行なう前に、検鏡により $0.1 \mu\text{m}$ 以上であることを確認する。微生物体内に蓄積するPHA顆粒の大きさは、上述のように $0.1 \mu\text{m}$ 以上が好ましく、 $0.1 \mu\text{m}$ 未満の顆粒は分離精製過程において排除される可能性がある。

また、菌体中のPHA蓄積量も限定されないが、本発明の方法は菌体中のPHA蓄積量が高いばあいにとくに有効であり、好ましくは80重量%以上である。

本発明において用いられる溶菌酵素は、細胞壁を消化するが、顆粒膜を消化しないものならば何でもよい。そのような酵素としては、たとえばリゾチームがあげられる。

15 まず、前記菌体を懸濁した水性溶液に、溶菌酵素を $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/ml}$ 添加して室温、約pH 6~8.5にて10~60分程度消化を行なう。

溶菌酵素処理によりえられたPHA顆粒を含有する液から、PHA顆粒を分離回収する。PHA顆粒の分離は、20 遠心分離、濾過、電気泳動などによって行なうことができる。工業的規模で行なうばあいには、遠心分離または濾過が好ましい。

遠心分離によってPHA顆粒を分離するばあいには、遠心分離は約 $9,000 \sim 12,000 \times g$ で2~15分間程度行なうのが好ましいが、PHA顆粒の形状および大きさなどにより適宜決定されるべきである。

濾過によってPHA顆粒を分離するばあいには、通常使用される精密濾過膜や限外濾過膜を使用できる。たと

(43)

例えば、ポリエチレンやポリプロピレン、ポリテトラフル  
オロエチレン、ポリカーボネートなどのフィルム、メン  
ブレンに特定の孔を形成させたものがあげられる。該濾  
過膜の孔の大きさは、通常少なくとも $0.05\mu\text{m}$ 以上であ  
5 5る。遠心分離と濾過とを組み合わせることによっても効  
率的、あるいは高精度で達成できる。

そのようにして分離されたPHA顆粒を蛋白分解酵素  
処理することにより、PHA顆粒膜を溶解除去する。す  
なわち、PHA顆粒を $\text{pH}6\sim8$ の $10\sim100\mu\text{M}$ トリス  
10 -  $\text{HCl}$ 緩衝液またはリン酸緩衝液中に再懸濁し、蛋白  
分解酵素を $100\sim1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加して $30\sim40^\circ\text{C}$ にて $30$   
 $\sim60$ 分間反応させることにより行なう。

用いられる蛋白分解酵素はとくに限定されないが、た  
例えばプロナーゼ、ナガーゼ、ビオプラーゼ、パパイン、  
15 トリプシンなどがあげられる。

蛋白分解酵素処理後、再び遠心などによりPHAを分  
離する。必要に応じて反応後に水で洗浄を行なう。

PHA顆粒膜の溶解除去は、前記のように顆粒を分散  
した溶液から行なうことも可能であるが、PHA顆粒を  
20 直接溶融、成形したのちに行なうこともできる。成形条  
件としては、PHAの分解温度以下にて行なうことが必  
須である。好ましくは、分解点以下にて圧力をかけて焼  
結体を形成することが好ましい。成形後に処理すること  
により、処理中に顆粒が壊れずにPHAが回収しやすい  
25 などの工業的メリットがある。また、蛋白分解酵素処理  
が容易に行なわれるように、成型はフィルム、シート、  
集積体または糸状などのようにできるだけ表面積が大き  
くなるような形に行なう。そうすることにより、溶解処

理面積増大にともなう処理時間の低減が図られる。このように成形されたPHA顆粒をそのまま、または細断して蛋白分解酵素を溶解した緩衝液に加え、前記と同様にして反応せしめ、蛋白質を溶解除去する。

- 5 または、菌体を溶菌酵素処理したのち、前記のように蛋白分解酵素処理を先に行なってから、前記の分離操作によりPHAを分離することも可能である。蛋白分解酵素処理を適切に行なうことによりPHA顆粒は膜が溶解されたのちも顆粒状を保ち、その後につづく分離操作は  
10 容易に行なうことができる。

なお、本発明の分離・精製法においては必要に応じて、溶菌処理の際に核酸分解処理を行なってもよい。核酸分解処理は、たとえば小ウシのパンクレアス由来デオキシリボヌクレアーゼI (400 ~ 600 U/mg) などの核酸分  
15 解酵素を加えることにより行なわれる。

また、本発明の分離・精製法においては必要に応じて、溶菌処理後に超音波処理および10KHz程度の可聴音波を使用した音波処理を行なうこともできる。このばあいの超音波処理および10KHz程度の可聴音波を使用した  
20 音波処理条件としては、PHA顆粒自体が分解しない程度の処理を行なう。また、必要に応じてPHA分散液を冷却する。菌の種類により、処理条件は当然変わってくるが、10KHz以上1000KHz程度の音波あるいは超音波を使用する。これらの周波数は微生物の種類によっ  
25 ても変えることは任意である。強度は、通常 $0.05 \text{ W/cm}^2$ 以上好ましくは、 $0.1 \sim 50 \text{ W/cm}^2$ 、さらに好ましくは $1 \sim 30 \text{ W/cm}^2$ 程度である。ただし、菌体の超音波処理に通常用いられる超音波強度 ( $1 \text{ W/cm}^2$  程度) よりか



(15)

なり強い強度（ $10 \sim 30 \text{ W} / \text{cm}^2$  程度）の超音波を用いて処理しても、菌体中のPHA顆粒は破壊されない。一方、その他の菌体成分は速やかに微細化される（本発明の方法にしたがってリゾチームで処理されたのちのロドバクター キャプスレイトスのばあい、 $20 \text{ KHz}$ 、 $20 \text{ W} / \text{cm}^2$ 、5分の超音波処理により菌体は微細化された）。したがって、超音波の強度が強いほど処理が短時間で済み、効率的である。

以上のような方法により精製されたPHAがえられる。

10

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例4でえたポリマーの分子量分布曲線である。

図2は、実施例4でえたポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

15 図3は、実施例4でえたポリマーの $^1\text{H}$ -NMRスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

図4は、実施例4でえたポリマーの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

#### 発明を実施するための最良の形態

20 つぎに本発明のPHAの製造法およびPHA蓄積菌体からPHAを分離・精製する方法を実施例に基づいて説明するが、本発明はもとよりかかる実施例のみに限定されるものではない。

#### 実施例1

25 ロドバクター キャプスレイトス ATCC 11166 を保有培地からニュートリエントブロス10mlを入れたL字管に

(16)

移植し、24時間、37℃にて振とう培養（振幅6cm、92回／分、以下実施例2および3にて同じ）を行なって3代継代した。つぎに同組成のニュートリエントブロス100mlを入れた坂口フラスコ10本を調製し、前記継代培養液5を2%の割合となるように移植し、48時間、37℃で振とう培養後、3000G、15分の条件で遠心分離して集菌した。これを生理食塩水200mlに懸濁して、再びこれを同様に遠心分離して集菌した。同じ操作を3回繰り返して洗浄菌体をえた。

- 10 つぎに、チッ素飢餓培養を好気条件下で行なった。すなわち、酢酸ナトリウム10g、リン酸1カリウム1g、リン酸2カリウム1g、硫酸マグネシウム7水塩0.2g、塩化カルシウム1水塩0.05g、チアミン塩酸塩0.005g、酵母エキス1g、水1リットル、pH7.0の飢餓培養培  
15地をつくった。前記洗浄菌体を飢餓培養培地1リットルに加えて混合し、懸濁せしめた。500ml容坂口フラスコ10本に100mlずつ分注し、37℃で振とう培養を8日間行なった。培養後の菌体を遠心分離により前記と同様の条件で集め、アセトン100mlを加えて懸濁し10分間静置し  
20たのち、遠心分離を3000G、5分間の条件で行なって菌体を集めた。これを4回繰り返すことによって菌体を脱水した。菌体に付着するアセトンを風乾により揮散させた。

つぎにクロロホルム200mlを加えて懸濁液となし500  
25ml容ナス型フラスコへ移し、70℃の湯浴中で還流冷却器を付けて3時間保ったのち、室温まで冷却後、東洋濾紙No.2濾紙で濾過してクロロホルム溶液と菌体を分離した。菌体をクロロホルムで洗浄し前記クロロホルム溶液と合

(17)

わせた。つぎに濾液を500ml容ナス型フラスコへ移し、35℃で減圧蒸留してクロロホルムを留去した。該フラスコ内に残った膜状のポリマーを、メタノール、アセトン、ヘキサンおよびエーテルをこの順番に用いて洗浄したのち乾燥し、再びクロロホルムに溶解後一旦濾過してクロロホルム溶液をえた。クロロホルムを留去して該ポリマーを該フラスコ内に残留せしめて6gをえることができた。同様の精製操作を3回繰り返し、PHBを主成分としたポリマーをえることが出来た。

- 10 比較例として、同組成の培地で嫌気照明下の光合成条件下で培養後、チッ素飢餓培養も嫌気照明下で培養を全く同じ時間続けたが、該ポリマーの菌体内蓄積量は乾燥菌体1グラム当たりわずか0.2gであった。

この結果から明らかに好気条件下において、PHBを主成分としたPHAの生産が高いことがわかる。

#### 実施例2

チッ素源およびその含有率を変化させたほかは培養を実施例1とまったく同様にして、培養を実施した。チッ素源は硫酸アンモニウムを用い、チッ素源と微生物の栄養である炭素源との比、すなわちC/Nを約1.8~ $\infty$ として培養した。えられた菌体の乾燥菌体当たりの該ポリマーの菌体内蓄積量を表1に示す。なおチッ素飢餓培養でないことは培養後のチッ素源の測定値を見れば残存量が示されていることから明らかである。

- 25 表1に示されるように、完全なチッ素飢餓によらなくてもPHAの製造は可能であり、チッ素として2g/l以下においてはチッ素飢餓状態でのPHAの生産と何ら変わりのない生産性を有することが分かる。これは、本

(18)

発明のロドバクター菌を用いた大きな特徴である。

表 1

培地および培養液中の窒素濃度と菌体内のPHA量との関係

Exp. No.	C/N	培養開始時 培地中の N (g/l)	培養後培養 液中の 残 存 N (g/l)	菌体内 PHA 含有 量 (%)	炭素利用率 (%)
1	1.86	2.73	2.60	20.5	0.68
2	3.73	1.36	1.19	38.5	6.18
3	9.32	0.55	0.43	42.4	7.79
4	18.6	0.27	0.18	37.2	7.81
5	$\infty$	0	0	60.3	11.1

### 実施例 3

- 5 実施例 1 に記載の方法と同じ方法にて、飢餓培養における培養の条件を変え、炭酸源をグルコース、培養温度を 27℃、培養時間を 4 日間とした。グルコースの初発濃度は表 2 に示す。

培養後の生菌数を平板希釈培養法で測定した結果

- 10 (Y P S 寒天培地を使用)、培養前と大差がなく、グルコース濃度がいずれのばあいも近似した生菌数を示し、  
 (2.7 × 7.9) × 10<sup>7</sup> / ml であった。飢餓培養 2 日間後には生菌体のまま位相差顕微鏡で観察すると菌体内にポリマーの顆粒が蓄積しており、1 菌体当たり、3 ~ 5 粒  
 15 子であった。さらに培養を続け、培養開始後 4 日目には菌体の形態は球状 (直径 1 μm 程度) およびラグビーボール状 (短径 1 μm、長径数 μm 程度) に近いまでに変

(19)

化し、しかもすべての菌体内が P H A 顆粒で満たされるに至った。結果を表 2 に示す。

以下の結果から、培養温度が 27℃ においても P H A が生産されること、炭素源として糖類の代表的なグルコースを使用しても P H A が生産されることがわかる。4 日間培養後には菌体内が多量の P H A で充満したため、光学顕微鏡を用いて蓄積過程をモニターできたので、P H A を抽出して分析するまでもなく培養終了の適期を判定できた。なお、P H A の確認は、菌体をオブジェクトグラス上に火炎固定後スダンプブラックにより染色後検鏡する従来の方法にても確認した。

表 2

Exp. No.	グルコース (g/l)	乾燥菌体 (g/l)	PHA (g/l)	PHA 菌体内含有量 (%)	炭素利用率 (%)	備考
6	30.0	4.23	2.37	56.4	9.2	本発明
7	25.0	4.49	1.62	36.0	7.6	本発明
8	20.0	4.38	2.73	62.0	15.9	本発明
9	15.0	3.95	2.81	70.3	21.8	本発明
10	10.0	2.90	2.27	78.2	26.3	本発明
11	5.0	2.52	0.04	16.0	1.0	本発明

#### 実施例 4

ロドバクター キャプスレイタス ATCC 11166 をを保有培地から Y P S 培地（以下に組成を示す）10ml を入れた 500ml 容坂口フラスコに移植し、24～48 時間、37℃ に

(20)

て振とう培養（振幅 3.5 cm、100 回／分、以下すべて同じ）後、3000 G、15 分の条件で遠心分離して集菌した。これを生理食塩水 100 ml に懸濁して再びこれを同様に遠心分離して集菌した。同じ操作を 3 回繰り返して、洗浄菌 5 体をえた。

この菌体を、チッ素飢餓培地に酵母エキス（ナカライテスク社製）1.0 g／ℓ 添加したものおよび酵母エキス（ディフコ社製）1.0 g／ℓ 添加したものそれぞれ 100 ml を入れた 500 ml 容坂口フラスコに移植した。

10 Y P S 培地の組成

酵母エキス	0.3 %
ポリペプトン	0.3 %
M g S O <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.05 %
C a C l <sub>2</sub>	0.03 %

15 (p H 7.40)

チッ素飢餓培地の組成

	K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	1.0 g / ℓ
	K <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>	1.0 g / ℓ
	M g S O <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g / ℓ
20	C a C l <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.05 g / ℓ
	F e S O <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.01 g / ℓ
	チアミン塩酸塩	5 mg / ℓ
	ニコチン酸	2 mg / ℓ
	ビオチン	2 mg / ℓ
25	グルコース	10 mg / ℓ

(p H 7.40)

37℃ にて 86 時間振とう培養を行なったのち、菌体を遠心分離により前記と同様の条件で集め、アセトン 100 ml

(21)

を加えて懸濁し10分間静置したのち、遠心分離を3000 G、15分間の条件で行って菌体を集めた。これを3回繰り返すことによって菌体を脱水した。菌体に付着するアセトンを風乾により揮散させた。

5 つぎにクロロホルム20mlを加えて懸濁液となし500ml容ナス型フラスコへ移し、65℃の湯浴中で還流冷却器を付けて3時間保ったのち、室温まで冷却後、東洋濾紙No. 2濾紙で濾過してクロロホルム溶液と菌体を分離した。菌体をクロロホルムで洗浄し前記クロロホルム溶液と合  
10 わせた。つぎに濾液を500ml容ナス型フラスコへ移し、35℃で減圧蒸留してクロロホルムを留去した。該フラスコ内に残った膜状のポリマーを、メタノール、アセトン、ヘキサンおよびエーテルをこの順番に用いて洗浄したのち乾燥し、再びクロロホルムに溶解後一旦濾過してクロロ  
15 ホルム溶液をえた。クロロホルムを留去してエステルをえた。同様の精製操作を3回繰り返し、PHBを主成分としたPHAをえた。

こうしてえられたPHAの量は、前者が0.0953 g / ℓで後者が0.0925 g / ℓであった。また、PHAの菌体内  
20 含有率（すなわち菌体重量に対するえられたPHA重量割合）はそれぞれ36.0%および41.0%であった。

以上の結果より、添加する酵母エキスの種類によって、えられるPHA生産量および菌体内含有率に差がないことがわかる。

#### 25 実施例 5

ロドバクター キャプスレイタス ATCC 11166 を酵母エキス1 g / ℓ添加および無添加で、あとの条件は実施例1と同様に飢餓培養した。酵母エキスはナカライテス

(22)

ク社製のものを用いた。32℃にて86時間培養したのち、実施例1と同様にしてPHAをえた。

酵母エキスを添加したばあいでは、えられたPHAは109.9mg/100ml培地であり、無添加のばあいでは14.1mg/100ml培地であった。PHAの菌体内含有量はそれぞれ38.6%および32.9%であった。

この結果より、培地に酵母エキスを加えることにより培地当りのPHA量が著しく増大することがわかる。

しかしながら、飢餓培地にはロドバクター キャプス 10 レイタス ATCC 11166 の増殖に必須のチアミン、ピオチン、ニコチン酸が充分量添加されているので、酵母エキスの添加は一般に知られている増殖のための添加ではない。PHAの菌体内含有量が増加していることからわかるように、ここで行なわれた酵母エキスの添加は増殖 15 ではなくPHA蓄積量を増大させる効果を有する。

#### 実施例 6

実施例5とまったく同様にして、チッ素飢餓培地に添加する酵母エキス（ナカライテスク社製）の割合を変えて培養を行ないPHAをえた。以下にその結果を示す。

20

表 3

酵母エキス添加量 (g/l)	PHA (g/l)	PHA 菌体内含有率 (%)
2.0	0.06	24
1.0	0.10	36
0.5	0.11	51
0.1	0.02	28
0	0.01	21



(23)

表 3 より、以下のことがわかる。

- (1) 酵母エキスを無添加のばあいの P H A 生産量は培地 1 リットル当たり 0.01 g であり酵母エキス 0.5 g / ℓ 添加したばあいの 1/10 以下である。
- 5 (2) 酵母エキスを 2.0 g / ℓ 添加したばあいには P H A 含有量は 1.0 g / ℓ 添加時よりも減少し、菌体内含有量も減少した。したがって添加量が多くなればなるほど P H A 生産量が増大するものではない。

#### 実施例 7

- 10 酵母エキスの代わりにエビオス錠（商品名、田辺製薬株式会社）を乳ばちで粉末にしたものを使用したことを除いては実施例 3 と同様にして培養を行なった。結果を表 4 に示す。

表 4

エビオス添加量 (g/ℓ)	PHA (g/ℓ)	PHA 菌体内含有率 (%)
2.0	0.02	1.6
1.0	0.12	9.8
0.5	0.02	5.3
0	0.00	0

- 15 酵母として、エビオスのような乾燥菌体を用いても良好な結果がえられることがわかる。エビオスのばあいでは、培地 1 リットル当たり 1.0 g 添加の際に P H A 含有率が高い。

#### 実施例 8

- 20 ロドバクター キャプスレイタス ATCC 11166 を実施

24

例 1 と同様にして Y P S 培地 300ml に移植して培養し洗  
 浄菌体をえた。これへ生理食塩水 7 ml を加えて懸濁液を  
 作り、その 2 ml ずつをとり、以下に記すチッ素飢餓培地  
 へ移植した。チッ素飢餓培地は、実施例 1 に記した組成  
 5 のものに酵母エキス（ディフコ製）を 1 g / l 添加した。  
 pH は 4.7、6.0 および 7.0 の 3 種類をつくり、各培地  
 50 ml を 500 ml 容坂口フラスコへ入れて調製した。15 時間  
 培養後、それぞれの pH を 1N の塩酸を用いて 4.4、4.6  
 ~ 4.7 および 6.0 ~ 6.3 とし、さらに 50 時間培養をつづ  
 10 けた。培養後、集菌し、実施例 4 に記載の方法で P H A  
 を抽出して菌体内の含有量を測定した。結果を表 5 にま  
 とめた。

すなわち、(1) の P H A は pH 4.4 においては蓄積が  
 著しく低下し、ほとんど蓄積されないことを示している。  
 15 (2) の 15 時間 pH 5.9 ~ 6.1 で培養したばあいでは P H  
 A を蓄積したが pH 4.6 ~ 4.7 に 50 時間保持したため 24  
 % となった。(3) の 15 時間 pH 6.6 ~ 7.0 とし、以後 50  
 時間を 6.0 ~ 6.3 としたばあいには 42% の容量を蓄積し  
 た。培養後の菌体収量は大差なかった。

20

表 5

	最初の 15 時 間後の pH	続く 50 時間 後の pH	菌体内 PHA (%)	乾燥菌体量 (g/l)
(1)	4.7	4.4	4.1	1.75
(2)	5.9 ~ 6.1	4.6 ~ 4.7	24	1.58
(3)	6.6 ~ 7.0	6.0 ~ 6.3	42	1.02

(25)

## 実施例 9

ロドバクター キャプスレイトス ATCC 11166 および  
ロドバクター スフェロイデス (Rhodobacter  
Sphaeroides) IFO 12203 をそれぞれ実施例 4 と同様に  
5 YSP 培地 200ml へ移植し、48時間、27℃で培養したのち  
集菌、洗浄菌体をえた。

飢餓培養の炭素源をマンニット 10 g / l、酵母エキス  
(ナカライテスク社製) 1 g / l に調製した実施例 4 に  
記載の培地 200ml へ洗浄菌体を移植し、27℃で90時間振  
10 とう培養した。集菌して実施例 4 と同様にして PHA を  
抽出し、菌体内含有量を測定した。結果を表 6 に示した。

表 6

菌 株	PHA (g/l)	PHA 菌体内 含有率 (%)
ロドバクター キャプスレイトス ATCC 11166	0.24	12.1
ロドバクター スフェロイデス IFO 12203	0.20	7.82

この結果より、pH の低下をひき起さず、アミノカル  
ピノール反応による菌体増殖制御の心配もないマンニッ  
15 トが、PHA 生産の際の炭素源として有効に用いられる  
ことがわかる。

## 実施例 10

実施例 1 に記載の好気培養により製造した PHA の性  
状を確認するために分子量分布、熱分析 (DSC)、赤  
20 外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルを測定した。

NMRによる分析の結果、PHAはポリ-3-ヒドロキシ酪酸を主成分とし、他の共重合成分として微量（5mol%程度）のポリ-3-ヒドロキシ吉草酸からなっていた。また、GPC測定の結果、数百のM<sub>w</sub>を有するオリゴマー部分と数十万のM<sub>w</sub>を有する高分子量部分にピークを有していた。DSC測定の結果、163～165℃に融点を有している。融解熱の値より、結晶性はかなり高いことが判明した。

#### 実施例11

- 10 実施例4により製造したPHAの性状を確認するために、熱分析（DSC）、分子量分布測定（GPC）および核磁気共鳴スペクトルの測定（NMR）を行なった。以下にその条件と結果を示す。

##### (1) GPC

- 15 (検液)

試料約30mgにm-クレゾールを10ml加え40℃にて完全に溶解したのち、CHCl<sub>3</sub>で50mlにメスアップし、0.45μのメンブランフィルターで濾過したものを検液とした。

##### (測定条件)

- 20 ポンプ：CCPD（東ソー）  
カラム：GMHXL（東ソー）  
溶離液：m-クレゾール／CHCl<sub>3</sub>（1:4）  
流量：1.0 ml/min  
温度：40°（恒温槽CO-8011 東ソー）  
25 Det.：RI-8010（東ソー）  
注入量：50μl

##### (分子量校正曲線)

標準ポリスチレンより作成し、分子量は標準ポリスチ

(7)

レン分子量の換算値表わす。

(データ)

分子量分布曲線を図 1 に示す。

(結果)

- 5 データより実施例 4 の P H A の  $M_w$  は 174 万、 $M_n$  は 80 万であることがわかった。 $M_w/M_n$  は 2.2 であった。

(2) D S C

測定結果を図 2 に示す。

この結果から、実施例 4 の P H A の  $T_m$  は 163.7 °C であ  
10 ることがわかった。

(3) N M R

磁場を 300MHz として、溶媒は重水素化クロロホルムを用いて N M R を行なった。

実施例 4 でえられた P H A についての  $^1H-NMR$  の  
15 測定結果を図 3 に、 $^{13}C-NMR$  の測定結果を図 4 に示した。

N M R の結果より、実施例 4 でえた P H A はヒドロキシ酪酸 (P H B)、ヒドロキシ吉草酸 (P H V) 単位を含むことおよびその比が約 95 : 5 であることがわかった。

20 実施例 12

実施例 2 の Exp. No. 4 で回収した P H A および実施例 4 で生成・回収した本発明による P H A をクロロホルムに溶解しガラス板上にキャスト、風乾しフィルム成型した。このフィルムを当研究所庭 (防府市鐘紡町 4 番 1 号)  
25 に埋めて強度、伸度、形態的な経時変化を観察した。結果を表 7 に示すが、約 60 日で完全に強度を失うまでに分解することがわかる。

表 7

試 料	放 置 日 数 ( 日 )			
	0	8	30	60
実施例 2 の PHA 厚 み (mm)	0.038	0.049	0.121	0.026
破断強度 (g)	163.8	59.0	44.0	0.0
破断伸度 (%)	6.20	3.23	3.13	0.00
実施例 2 の PHA 厚 み (mm)	0.065	0.135	0.098	0.033
破断強度 (g)	149.5	226.0	26.0	0.00
破断伸度 (%)	5.40	6.33	5.7	0.00
実施例 2 の PHA 厚 み (mm)	0.058	0.138	0.078	0.036
破断強度 (g)	104.4	226.0	31.2	0.00
破断伸度 (%)	6.70	5.17	5.60	0.00
実施例 4 の PHA 厚 み (mm)	0.075	0.090	0.087	0.029
破断強度 (g)	323.3	108.4	31.6	0.0
破断伸度 (%)	5.90	3.26	2.85	0.00

## 実施例 13

ロドバクター キャプスレイタス (ATCC 11156) を実施例 4 と同様にして培養した PHA 蓄積菌体 (菌体 1 個あたり粒径 0.4 ~ 0.6  $\mu\text{m}$  の顆粒が 2 ~ 3 個入っているのが観察された) 5 g (湿菌, 乾燥菌体 1 g に相当) を pH 7.0、50 mM リン酸緩衝液 30 ml に懸濁し、リゾチーム (塩化リゾチーム (精製) 卵白由来、ナカライテスク社製) 50 mg、1 M  $\text{CaCl}_2$  0.5 ml、デオキシリボヌクレ

(20)

アーゼ（シグマ製、タイプ I）を 0.5mg 加えて攪拌し、室温で 30 分間反応させた。ついで、氷冷下超音波処理を 20 KHz、10 分間行なった。つぎに遠心分離を 10,000 g で 30 分間行なって PHA 粒子画分を集めた。再度、PHA 画分を pH 8.0、50 mM リン酸緩衝液へ懸濁し遠心分離して PHA 画分を集めて精製を繰返し、粗 PHA（純度 75%）0.52 g をえた。粗 PHA を 150 °C で熔融し厚さ 50  $\mu$ m のフィルムに成形した。このフィルムを約 1 × 1 mm に碎断し、pH 7.0、50 mM リン酸緩衝液に浸漬し、  
10 プロナーゼ 20 mg を加え、80 °C、6 時間反応させた。反応後フィルムを水洗し乾燥した（0.5 g）。

## 実施例 14

ロドバクター キャプスレイタス (*R. capsulatus* ATCC 11166) を実施例 4 と同様にして培養したのち凍結乾燥した凍結乾燥菌体 100 mg（PHA 含有量 80%）を 50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）100 ml へ懸濁し、5 分間ゆるやかに攪拌した。検鏡の結果、菌体内 PHB 顆粒の直径は 0.4 ~ 0.8  $\mu$ m で 1 または 2 個が 1 菌体内に存在するのがわかった。ついで 1 M  $MgCl_2$  1 ml、リゾチーム（塩化リゾチーム（精製）卵白由来、ナカライテスク社製）50 mg、DNA アーゼ（シグマ製、タイプ I）1 mg および 0.1 M EDTA ナトリウム 2 ml を加えて攪拌して溶かした。30 分間攪拌後、容器を碎氷中へ移し、10 KHz で 2 分間処理した。遠心管へ移し、5000 G 20 分の  
25 条件で遠心分離し、上清をすて、50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）10 ml を加えて粗 PHA 懸濁液をえた。同条件で遠心分離して上清をすてたのち、0.01% トリプシンを含む同トリス塩酸緩衝液 3 ml を加えて、30 °C、10 分

(30)

間攪拌してP H A 顆粒膜蛋白質を溶解した。これを5000 Gで10分間遠心分離して上清をすて、沈降したP H A へ同緩衝液10mlを加えて攪拌後5000 G、10分間の条件で遠心分離した。上清をすて沈降したP H A を凍結乾燥した。

5 収量は75mgであった。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリヒドロキシ有機酸の製造法は、従来提案されている方法に比べてポリマーの生産効率、菌体内蓄積率が高く、また、生成ポリマーの安定性も高いなど、

10 従来見出されていない大きな特徴を有する。また、菌体内蓄積率が非常に高くできるために、ポリマーの抽出や精製にも非常に有利である。さらに光エネルギーを使用せず、またチッ素飢餓によってもよらなくても該ポリマーを製造することができるなど製造プロセス、条件が従

15 来の方法に比べて非常に工業的に有利である。したがって、その経済的価値も非常に大きい。

また、本発明の分離・精製法により、P H A 蓄積菌から、安全に効率よく、純度の高いP H A を分離・精製することが可能である。



(31)

請求の範囲

1. ロドバクター属に属する微生物を、好気条件下で培養し、ポリヒドロキシ有機酸エステルからなるポリマーを生産させることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。  
5
2. ロドバクター属に属する微生物の培養が、チッ素源を含有する培地中、1段階で行なわれる請求項1記載のポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。
3. ロドバクター属に属する微生物の培養が、増殖のための前培養と、それに続くチッ素飢餓培養の2段階で行なわれる請求項1記載のポリヒドロキシ有機酸エステル  
10 の製造法。
4. ポリマー蓄積開始後集菌までの培養液のpHを4.5以上に保持して培養し、菌体内に該ポリマーを蓄積せしめる請求項1、2または3記載のポリヒドロキシ有機酸  
15 エステルの製造法。
5. 蓄積開始後集菌までの培養液のpHを4.5～8.5に保持する請求項4記載のポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。
- 20 6. 菌体内に該ポリマーを蓄積させるための培地に酵母を添加する請求項1、2、3、4または5記載のポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。
7. 培地に添加する酵母が酵母エキスである請求項6記載のポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。
- 25 8. 炭素源の主成分がマンニットである培地を用いる請求項1、2、3、4、5、6または7記載のポリヒドロキシ有機酸エステルの製造法。

(32)

9. ポリヒドロキシ有機酸エステルがポリ-3-ヒドロキシ酪酸を主成分とするポリマーである請求項1記載の方法。
10. ポリヒドロキシ有機酸エステルが炭素数5以上の有機酸エステルユニットを含有するコポリマーである請求項1または9記載の方法。
11. ポリヒドロキシ有機酸エステル蓄積菌体からポリヒドロキシ有機酸エステルを分離・精製する方法であって、菌体懸濁液へ溶菌酵素を添加して細胞壁を溶解する工程ののち、細胞質中に存在する顆粒皮膜で覆われた粒径 $0.1\ \mu\text{m}$ 以上のポリヒドロキシ有機酸エステル顆粒について、これを分離回収して集める工程と、しかるのちに蛋白分解酵素処理によって顆粒皮膜を除去する工程とからなることを特徴とするポリヒドロキシ有機酸エステルの分離・精製法。

FIG. 1

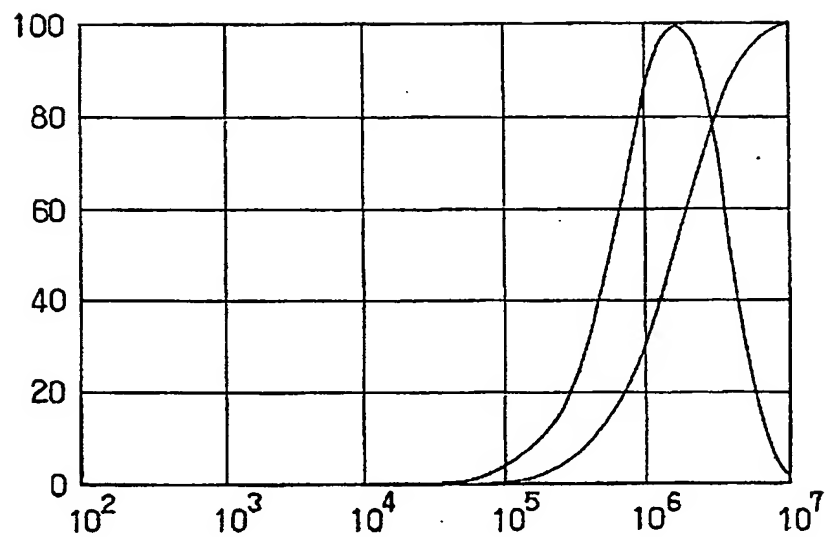


FIG. 2

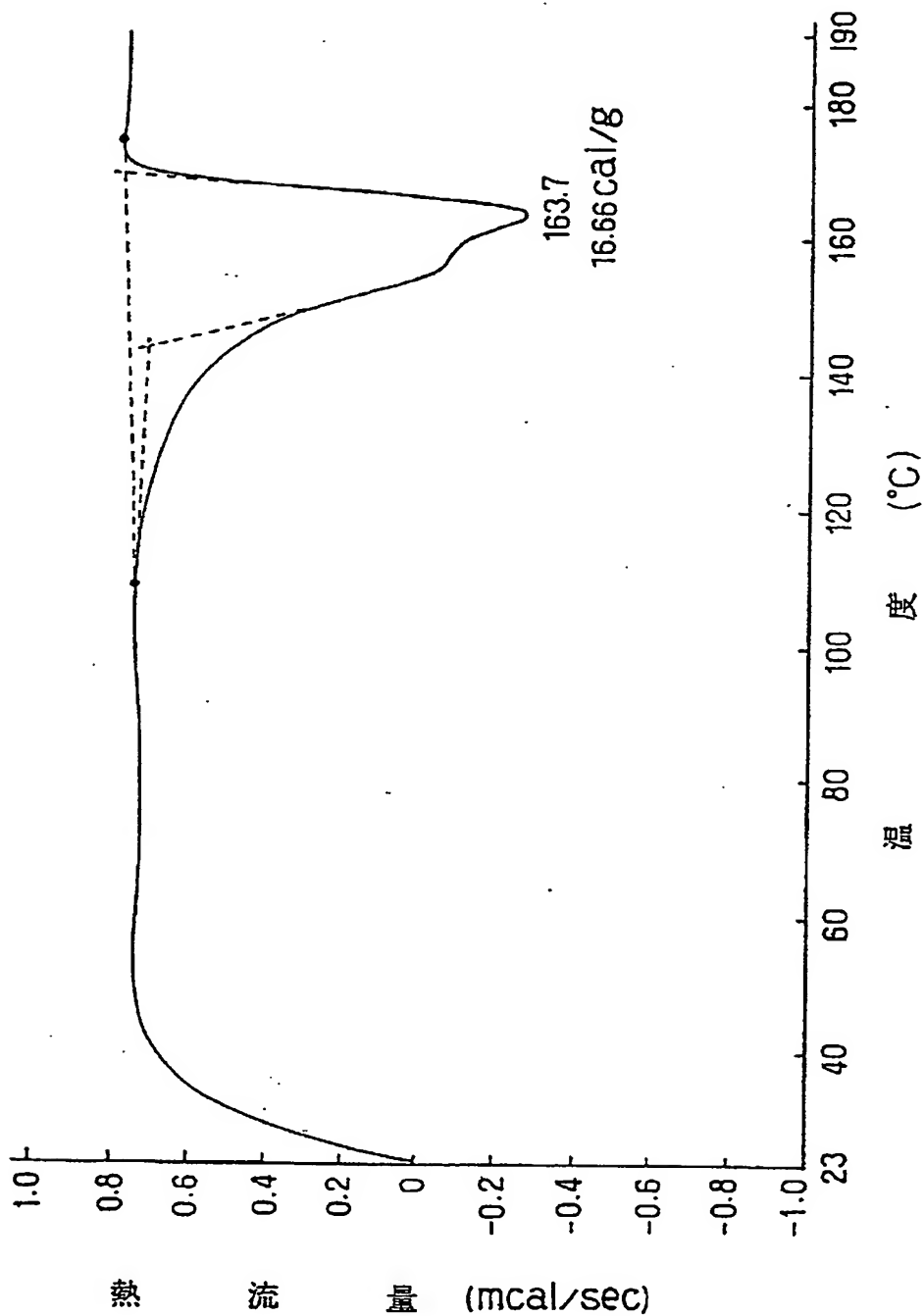


FIG. 3

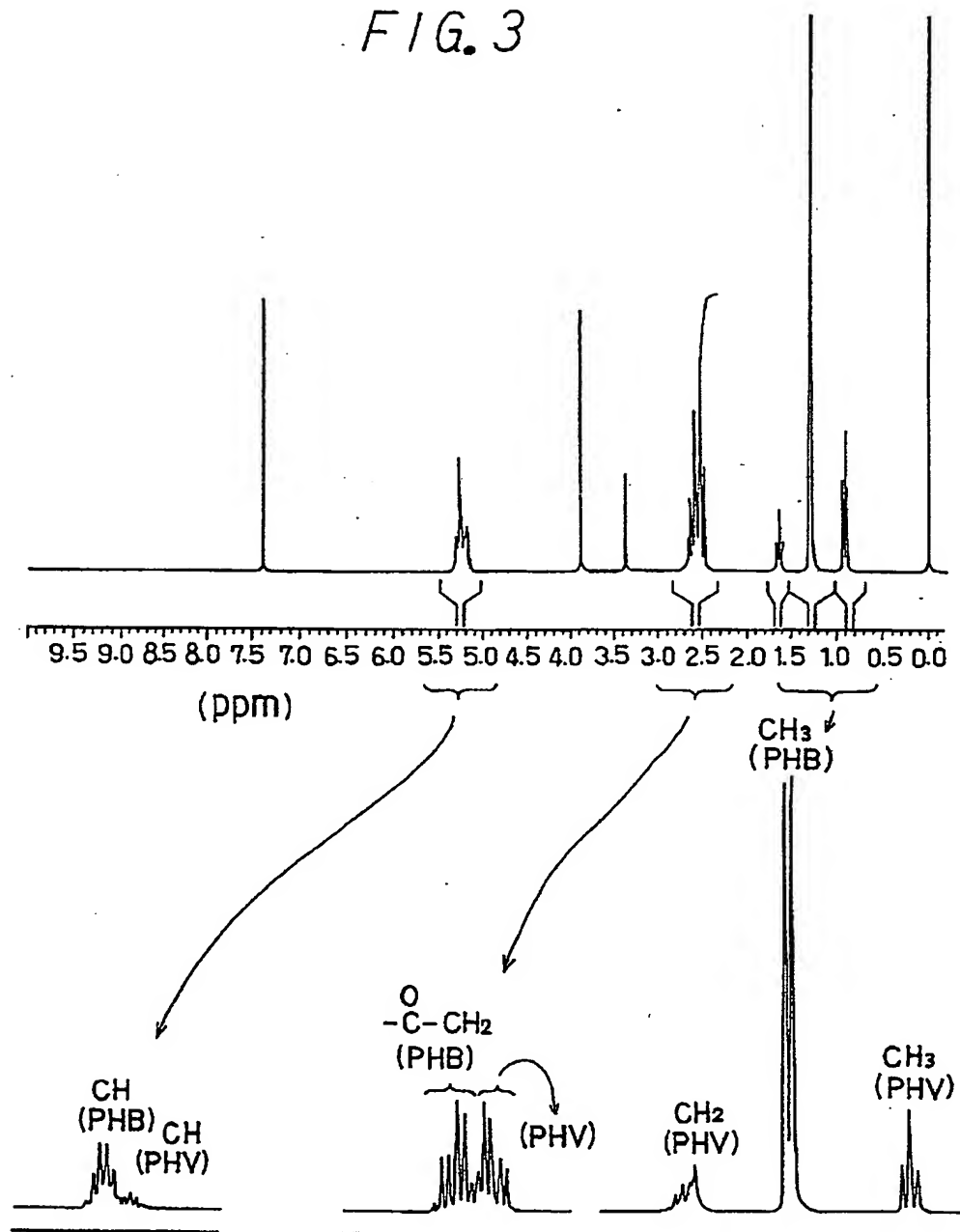
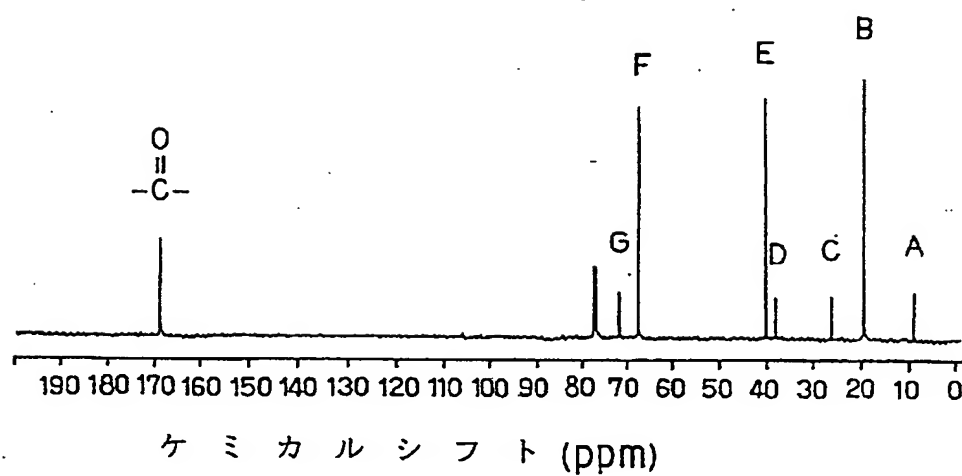


FIG. 4



- |   |  |       |
|---|--|-------|
| A | $\text{CH}_3$  | (PHV) |
| B | $\text{CH}_3$  | (PHB) |
| C | $\text{CH}_2$  | (PHV) |
| D | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{CH}_2 \end{array}$ | (PHV) |
| E | $\text{CH}_2$  | (PHB) |
| F | $\text{CH}$  | (PHB) |
| G | $\text{CH}$  | (PHV) |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00751

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C12P7/62		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P7/62	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
Biosis System		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>1</sup>		
Category <sup>2</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	Prikl Biokhin Mikrobiol, Vol. 25, No. 6, 1989, p. 785-789 "Phototrophic Bacteria as Producers of Poly-bets-hychoxybutuyraxe" Refer to Biosis Number 89103570. Kondrateva EN, Krasil'nikova EN (Russ)	1-10
P	Archives of Microbiology, Vol. 155, No. 4, (1991), Brandl H. et al. "The accumulation of Polny-3Hydroxyalkanoates in Rhodobacter-Sphaerides" p. 337-340	1-10
A	JP, A, 63-198991 (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), August 17, 1988 (17. 08. 88), (Family: none)	11
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
August 26, 1992 (26. 08. 92)	September 14, 1992 (14. 09. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号 PCT/JP 92/00751

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int. Cl. C12P7/62		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分類体系	分類記号	
IPO	C12P7/62	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biosis System		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Prikl Biokhin Mikrobiol 第25巻第6号 1989 p. 785-789 "Phototrophic Bacteria as Producers of Poly-beta-hydroxybutyrate" Biosis Number 89103570 参照. Kondratova E N, Krasil'nikova E N (Russ)	1-10
P	Archives of Microbiology, 第155巻第4号 (1991), Brandl H et al "The Accumulation of Poly-3-Hydroxyalkanoates in Rhodospirillum rubrum" p. 337-340	1-10
A	JP, A, 63-198991 (三菱レイヨン株式会社), 17. 8月. 1988 (17. 08. 88), (ファミリーなし)	11
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
26. 08. 92	14.09.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 1 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	鈴木 恵理子



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**